

对羟基联苯法定量测定发酵液中的乳酸

梁琼, 鲁明波, 卢正东, 何锋, 余龙江*

(华中科技大学生命科学与技术学院, 资源生物学与生物技术研究所, 湖北 武汉 430074)

摘要: 对传统的对羟基联苯法进行了优化, 应用于定量测定发酵液中的乳酸。首先对发酵液进行适当预处理, 去掉蛋白质和葡萄糖, 再利用正交设计对影响显色的几个重要因素进行了优化, 结果表明, 最佳测定波长为 565nm; 最佳显色条件为氢氧化钙 0.05g, 20% 硫酸铜 0.8ml, 浓硫酸 6ml, 0.5% 对羟基联苯 0.125ml, 静置时间 15min, 加热显色时间 5min。标准曲线回归方程为 $A=0.0189C-0.0808$ ($n=8$), $r=0.9989$ 。在 $15\sim 50\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好线性关系。平均回收率为 102.4%。显色稳定保持 2h 以上, RSD 为 2.6% ($n=12$)。该方法解决了传统对羟基联苯法显色时间长、准确度不高等问题, 适合于发酵液中乳酸含量的测定。

关键词: 乳酸; 定量测定; 对羟基联苯法; 正交设计

Determination of Lactic Acid in Fermentation Broth by p-Hydroxybiphenol Colorimetry

LIANG Qiong, LU Ming-bo, LU Zheng-dong, HE Feng, YU Long-jiang*

(Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: An improved colorimetric method was developed for the determination of lactic acid in fermentation broth. Firstly, the fermentation broth was given a suitable treatment that the protein and glucose were removed, and then the traditional colorimetry method applied for the determination of lactic acid was optimized by orthogonal test. The results showed that the optimum absorbance wavelength is 565 nm. The optimal colorimetric conditions are: 0.05 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0.8 ml 20% CuSO_4 , 6 ml concentrated H_2SO_4 , 0.125 ml 0.5% p-hydroxydiphenyl, reaction time 15 minutes and heating time 5 minutes. Linear range is $15\sim 50\mu\text{g/ml}$ ($A=0.0189C-0.0808$, $r=0.9989$). The average recovery is 102.4%. The color development for determination of lactic acid by colorimetric method is stable within more than two hours, and the RSD is 2.6% ($n=12$). The method established in this study is quick, accurate and stable.

Key words: lactic acid; determination; p-hydroxybiphenol colorimetry; orthogonal test

中图分类号: TQ921.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0357-04

乳酸是一种重要的食品添加剂, 乳酸钙、乳酸锌、乳酸铁等衍生物是重要的药品, 同时, 乳酸也是合成新型可降解材料聚乳酸(PLA)的单体物质, 因此, 乳酸一直受到国内外研究者的广泛关注^[1]。而建立一套快速准确的乳酸定量测定方法, 是乳酸相关研究顺利进行的基础。现有的乳酸定量测定方法, 包括对羟基联苯法^[2-5]、EDTA 滴定法^[6]、高效液相法^[7]、气相色谱法^[8]、酶法^[9]、毛细管电泳法^[10]、电位分析法^[11]、原子吸收法^[12]等, 都有各自的应用领域, 也有各自的优点和缺点。其中, 对羟基联苯法具有特异性好、灵敏度高的特点, 但多用于尿液、血液、啤酒、白酒等样品中微量乳酸的测定。虽然也有人尝试将其应用于发酵液

中乳酸的测定^[5], 但是测定显色时间长, 且易受葡萄糖、蛋白质等物质干扰, 测定的准确度不高, 效果并不理想^[13]。本研究对传统的对羟基联苯法进行改进和优化, 先对乳酸发酵液进行预处理, 排除蛋白质和葡萄糖干扰, 然后采用正交实验优化显色条件, 结果测定简便、快速、准确, 适合于定量检测发酵液中的乳酸, 特进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

无水乳酸锂、对羟基联苯、钨酸钠、硫酸铜、氢

收稿日期: 2007-05-30

作者简介: 梁琼(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物与发酵工程。E-mail: lq5449@126.com

* 通讯作者: 余龙江(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向为资源生物技术。E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn

氧化钙、浓硫酸均为分析纯试剂。

钨酸溶液: 0.667mol/L 硫酸及 10%(W/V)钨酸钠溶液等体积混合, 使用前配制; 20%(W/V)硫酸铜溶液: 称取硫酸铜 20g, 加蒸馏水定容至 100ml; 对羟基联苯溶液: 称取对羟基联苯 1.5 g 溶于 100ml 的 0.125mol/L 氢氧化钠溶液中(配制时加热助溶, 溶解后为澄清液体), 贮存于棕色瓶中, 保存于 4℃ 冰箱; 乳酸标准储存液(0.5mg/ml): 精确称取无水乳酸锂 53.25mg, 溶于 50ml 蒸馏水中, 加 0.5mol/L 硫酸 10ml, 后加蒸馏水定容至 100ml, 混匀后保存于 4℃ 冰箱。

UNIC UV-2100 紫外可见分光光度计、TGL-16B 离心机、恒温水浴锅、具塞试管及具塞比色管。

1.2 方法

1.2.1 原理

乳酸在铜离子的催化下, 与浓硫酸作用生成乙醛, 乙醛能与对羟基联苯作用生成在 565nm 处有特征吸收的紫色物质。在一定浓度范围内, 乳酸含量与 565nm 处吸光度呈线性关系, 因此可以通过测定 565nm 处的吸光度来测定乳酸的含量。

1.2.2 发酵液样品预处理

取适量发酵液样品 5000r/min 离心 10min, 以除去菌体和碳酸钙沉淀, 吸取上清液 0.5ml 置于洁净离心管中, 加入等体积 1mol/l 硫酸, 静置, 10000r/min 离心 10min, 以除去硫酸钙(若发酵时没加入碳酸钙, 将发酵液离心取上清液即可), 取上清液适当稀释, 吸取稀释液 2.00ml 于洁净离心管中, 加入 2.00ml 钨酸溶液, 混匀, 室温静置, 直至溶液中出现明显絮状物, 10000r/min 离心 10min, 取上清液置于 10ml 洁净离心管中, 60℃ 水浴保温 30min 左右, 冷却待用。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

精确吸取 5ml 待测液于具塞试管中, 加入 0.1g 氢氧化钙, 混匀, 然后加入 0.2ml 20% 硫酸铜, 迅速混匀, 沸水浴 3min, 水浴冷却, 3000r/min 离心 5min, 取上清液 0.5ml 入比色管中; 加入 6ml 浓硫酸, 混匀, 沸水浴加热 5min, 取出后冰水浴冷却; 加入 1.5% 对羟基联苯溶液 0.1ml, 充分混匀, 静置 30min; 置于沸水浴中加热 90s, 冰水浴冷却, 以蒸馏水为参比液, 在 400~700nm 波长范围内进行扫描, 确定最大吸收波长。扫描结果(见图 1)表明, 最大吸收波长为 565nm。

2.2 最佳显色条件的确定

以氢氧化钙、硫酸铜、浓硫酸、对羟基联苯溶液用量、静置显色时间、最后加热显色时间为考察因素, 分别选择三个水平, 采用正交设计法优选最佳显色条

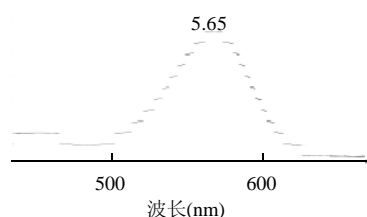


图 1 最佳吸收波长的确定

Fig.1 Determination of optimum absorption wavelength

表 1 $L_{27}(3^{13})$ 正交设计表

Table 1 $L_{27}(3^{13})$ orthogonal test

水平	A 静置时间 (min)	B 加热显色 时间(min)	C 对羟基联 苯(ml)	D 氢氧化 钙(g)	E 浓硫酸 (ml)	F 20% 硫酸 铜(ml)
1	0	1	0.1	0.05	6	0.2
2	15	3	0.125	0.1	7	0.5
3	30	5	0.15	0.15	8	0.8

表 3 正交试验直观分析结果

Table 3 Results of direct analysis

结果	A	B	C	D	E	F
均值 1	0.325	0.307	0.328	0.405	0.394	0.32
均值 2	0.361	0.349	0.373	0.361	0.368	0.318
均值 3	0.343	0.372	0.328	0.263	0.267	0.391
极差	0.036	0.065	0.045	0.142	0.127	0.073

表 4 正交试验方差分析表($\alpha=0.05$)

Table 4 Results of variance analysis ($\alpha=0.05$)

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
静置时间	0.006	2	0.353	4.1	
加热显色时间	0.02	2	1.176	4.1	
对羟基联苯加入量	0.012	2	0.706	4.1	
氢氧化钙	0.095	2	5.588	4.1	*
浓硫酸	0.081	2	4.765	4.1	*
20% 硫酸铜	0.031	2	1.824	4.1	
误差	0.08	10			

件, 试验计划与结果见表 1 和 2, 并采用直观分析法和方差分析法^[14]对正交试验结果进行统计分析。由表 3、4 可知, 氢氧化钙和浓硫酸的加入量对显色反应影响显著, 其余因素的作用不显著, 最佳显色条件为 $A_2B_3C_2D_1E_1F_3$, 即氢氧化钙 0.05g, 20% 硫酸铜 0.8ml, 浓硫酸 6ml, 对羟基联苯 0.125ml, 静置时间 15min, 加热显色时间 5min。

2.3 标准曲线的制作

0.5mg/ml 乳酸标准液与发酵液同样预处理后, 取 0、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.70、0.80、1.00ml 处理液, 分别加进 15 支预先编号的试管, 再用蒸馏水补足体积至 5ml, 按 2.2 所确定的最佳显色条件操作, 分别测定吸光度。以乳酸含量为横坐标, 吸光度为纵坐标作图得到图 2。

表2 $L_{27}(3^3)$ 正交试验设计与试验结果
Table 2 Design and results of $L_{27}(3^3)$ orthogonal test

试验号	静置时间 A	加热显色时间 B	AB	AB	对羟基联苯 C			氢氧化钙 D	浓硫酸 E	20% 硫酸铜 F			A _{565nm}	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.343
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.272
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0.239
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	0.447
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	0.111
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	0.491
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	0.188
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	0.503
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0.328
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0.251
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	0.308
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	0.347
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	0.318
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	0.508
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	0.194
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	0.52
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	0.489
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	0.315
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	0.333
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	0.322
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	0.351
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	0.212
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	0.577
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	0.286
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	0.34
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	0.271
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	0.398

由图2可知,乳酸标准应用液浓度在 $10\sim 80\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度基本呈线性关系,当浓度大于等于 $60\mu\text{g/ml}$

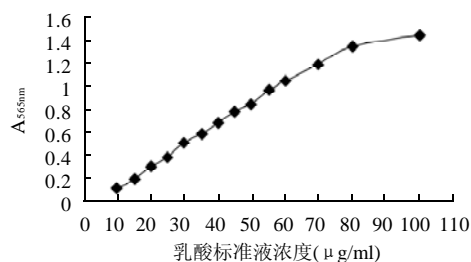


图2 乳酸标准应用液浓度与吸光度之间的关系

Fig.2 Relationship between lactic acid concentration and absorbance

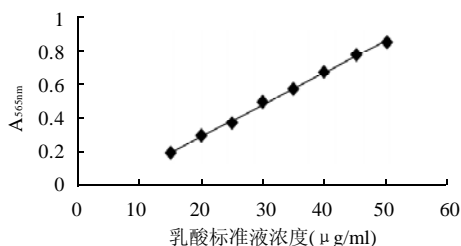


图3 乳酸标准曲线

Fig.3 Standard curve of lactic acid

时吸光度大于1。考虑到仪器误差的因素^[15],制备标准曲线时浓度取15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g/ml}$,得到如图3所示的乳酸标准曲线,求得标准曲线回归方程为 $A=0.0189C-0.0808$ (A 为吸光度, C 为乳酸浓度, $n=8$), $r=0.9989$,乳酸标准应用液浓度在 $15\sim 50\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好线性关系。

2.4 精密度实验

从同一乳酸发酵液中取样,经过预处理后,按2.2所确定的最佳显色条件操作,同时平行测定10个样品值,测定吸光度,结果见表5。所得吸光度RSD为4.3% ($n=10$),表明测定的精密度良好。

2.5 重现性实验

从同一乳酸发酵液中取6个样品,经过预处理后,按2.2所确定的最佳显色条件操作,测定吸光度,结果见表6。吸光度结果为3次测定平均值,RSD为5.5% ($n=6$)。说明采用本法测定乳酸含量有着良好的重现性。

2.6 回收率实验

在已知浓度为 $11.2\mu\text{g/ml}$ 的乳酸发酵液中加入不同量的乳酸标准溶液,按2.2所确定的最佳显色条件操作,测定吸光度,求平均回收率。结果见表7,结果

表8 稳定性实验结果 (n=12)
Table 8 Stability results of method (n=12)

时间(min)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
吸光度	0.869	0.859	0.876	0.859	0.879	0.871	0.849	0.879	0.840	0.829	0.811	0.832

表5 精密度实验结果 (n=10)
Table 5 Precision results of method(n=10)

平行样	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
吸光度	0.449	0.457	0.493	0.500	0.476	0.463	0.482	0.489	0.51	0.501

表5 重现性实验结果 (n=6)
Table 5 Repeatability results of method (n=6)

样品号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.573	0.514	0.534	0.578	0.598	0.562

表7 回收率实验结果
Table 7 Recover ration of lactic acid

样品	乳酸含量 ($\mu\text{g/ml}$)	添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	测定量 ($\mu\text{g/ml}$)	回收量 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	平均回收率(%)
1	11.2	8	19.6	8.4	105.0	102.4 \pm 4.6
2	11.2	16	27.3	16.1	100.6	
3	11.2	24	35.8	24.6	102.5	
4	11.2	32	42.5	31.3	97.8	
5	11.2	40	53.6	42.4	106.0	

表明,回收率在 97%~106% 之间,平均回收率为 102.4%,因此本法测定的准确度较好。

2.7 显色稳定性实验

从乳酸发酵液中取样,按 2.2 所确定的最佳显色条件操作,显色时,每隔 10min 测定一次吸光度,结果见表 8。RSD 为 2.6%(n=12),表明测定时显色稳定保持 2h 以上。

3 讨论

实验结果表明,对羟基联苯法测定发酵液中乳酸含量,最佳测定波长为 565nm;最佳显色条件为氢氧化钙用量 0.05g,20% 硫酸铜用量 0.8ml,浓硫酸用量 6ml,0.5% 对羟基联苯用量 0.125ml,静置时间 15min,加热显色时间 5min。标准曲线回归方程为 $A=0.0189C-0.0808$ (n=8),r 为 0.9989,在 15~50 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好线性关系;平均回收率为 102.4%;测定时显色稳定保持 2h

以上,RSD 为 2.6%(n=12)。

已有的对羟基联苯法测定乳酸的报道中,最佳测定波长以及氢氧化钙、硫酸铜、浓硫酸、对羟基联苯加入量、静置时间、加热显色时间等参数,不同的样品,其测定条件是不相同的,操作起来不方便。本研究对发酵液进行预处理,排除蛋白质和葡萄糖的干扰,使测定直接定量到乳酸,而不是全部有机酸,测定结果更接近真实值;采用正交设计法优化了显色条件,使测定全过程在 1.5h 内完成,操作简便,精确度和回收率高,显色稳定。在没有高效液相色谱等昂贵分析仪器情况下,快速准确定量测定发酵液样品中的乳酸,对羟基联苯法是一种理想的选择。

参考文献:

- [1] 钱志良,胡军,雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场[J]. 工业微生物,2001(6): 49-53.
- [2] 高庆,印建和,穆华容,等. 对羟基联苯法测定啤酒中乳酸[J]. 酿酒,2005(11): 93-95.
- [3] 朱新友,吴庆. 对羟基联苯法测定尿中乳酸的探讨[J]. 陕西医学检验,1999(8): 21.
- [4] 江培洪,陆红. 剧烈运动对尿中乳酸含量的影响[J]. 实验室研究与探索,2002(8): 83-84.
- [5] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社,1994: 213-214.
- [6] 郑志,姜绍通,潘丽军. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学,2003,24(3): 102-105.
- [7] HANG Y D, VALLINO J J. Direct fermentation of corn to L-(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*[J]. Biotechnology letters, 1989, 11(4): 299-300.
- [8] 吕九琢,徐亚贤,徐金龙. 气相色谱法测定发酵法乳酸产品中乳酸及有机杂质[J]. 北京石油化工学院学报,2003,11(3): 46-50.
- [9] 柳畅先,吴士钧. 酶法测定乳酸[J]. 分析试验室,2005,24(9): 75-77.
- [10] 陈正行. 电位分析法测定乳酸的含量[J]. 无锡轻工业学院学报,1994,13(3): 270-272.
- [11] 唐萍,田晶,苑广志,等. 毛细管电泳法测定乳酸发酵液中有有机酸[J]. 食品与发酵工业,2006,32(3): 76-78.
- [12] 孙为德,王伟. 原子吸收法测定牛奶中的乳酸[J]. 食品与发酵工业,1997,23(4): 58-60.
- [13] 李志斌,姚珍. 白酒中乳酸的测定方法[J]. 酿酒科技,2003(5): 81-82.
- [14] 刘定远. 医药数理统计方法[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社,1999: 172-192.
- [15] 北大化学系仪器分析教学组. 仪器分析教程[M]. 北京: 北京大学出版社,1997.